

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7 C12N 15/12, 5/10, 1/15, 1/19, 1/21, C12P 21/02, C07K 14/715, 16/28, G01N 33/53, 33/15, 33/50	A1	(11) 国際公開番号 WO00/49148 (43) 国際公開日 2000年8月24日(24.08.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/00939 (22) 国際出願日 2000年2月18日(18.02.00) (30) 優先権データ 特願平11/41936 1999年2月19日(19.02.99) JP (71) 出願人 ; および (72) 発明者 北村俊雄(KITAMURA, Toshio)[JP/JP] 〒108-0072 東京都港区白金6-16-20-406 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 藤尾圭志(FUJIO, Keishi)[JP/JP] 〒108-0074 東京都港区高輪2-16-42-501 Tokyo, (JP) (74) 代理人 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)		(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: NOVEL CYTOKINE RECFPTOR-LIKE PROTEIN (54) 発明の名称 新規サイトカイン受容体様タンパク質 (57) Abstract A gene encoding a novel cytokine receptor-like protein having a homology with the type I cytokine receptor super family is isolated from a differentiation-induced lymphocyte-origin cDNA library by using an originally developed cloning technique specific to a gene encoding a membrane secretory protein.		

独自に開発した膜分泌タンパク質をコードする遺伝子の特異的クローニング法を用いることにより、分化誘導したリンパ球由来 cDNA ライブラリーから、I 型サイトカイン受容体スーパーファミリーに相同性を有する新規なサイトカイン受容体様タンパク質をコードする遺伝子を単離した。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサオ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノールウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明細書

新規サイトカイン受容体様タンパク質

技術分野

本発明は血球系細胞で発現する新規なサイトカイン受容体様タンパク質、該タンパク質をコードする DNA、該 DNA を含むベクター、該ベクターを保持する宿主細胞、該タンパク質に対する抗体、該タンパク質を利用した化合物のスクリーニング方法、並びに該スクリーニング方法により単離しうる化合物に関する。

背景技術

免疫系、造血系の細胞は、サイトカインと呼ばれる一群の液性因子により、その増殖や活性が調節されていることが知られている。これまでに数多くのサイトカインが同定され、それらの解析が進んだ結果、多くのサイトカインは広範な生理活性を有しており、1つのサイトカインが多様な細胞に作用し、細胞によりさまざまな作用を示すことが明らかとなってきた。これらのサイトカインにより、造血細胞やリンパ系細胞、内皮細胞などの細胞間で情報伝達のネットワークが形成されており、これらの細胞の分化や増殖、活性化が制御されていると考えられている（小津真理子ら，1992，サイトカイン療法，南江堂，pp2-14）。サイトカインは、特に医療分野における臨床応用が期待されており、癌、感染症、自己免疫疾患、血栓症を含む種々の疾患に対する治療への応用が試みられている。

近年、多くのサイトカイン受容体が単離されており、それらの構造上の特徴から、いくつかのグループに分類されている。例えば I 型サイトカイン受容体ファミリーには、IL-2 β 受容体を含む多くのインターロイキン受容体やコロニー刺激因子受容体、エリスロポエチン受容体などが含まれ、ヘモポエチン受容体ス

ーパーファミリーとも呼ばれる。I型サイトカイン受容体ファミリーは構造的に共通する特徴を有し、細胞膜直上にトリプトファン-セリン-X-トリプトファン-セリン残基からなるWSボックス、通常それより先端に位置する4つのシステイン残基、フィブロネクチンIII型類似構造を有する。また、細胞内領域の膜の近くにbox1、そのC末側にbox2と呼ばれる比較的相同性の高い部分がある。これらの領域は、細胞内情報伝達にとって必須な領域と考えられている。そのほかのサイトカイン受容体ファミリーとしては、インターフェロン α/β 受容体等が含まれるII型サイトカイン受容体ファミリーや、TNF受容体/NGF受容体ファミリーなど、複数のファミリーが知られている(Miyajima, A. et al., An n. Rev. Immunol. (1992) 10, 295-331)。

このように多数のサイトカイン受容体が同定されているものの、サイトカインの情報伝達には未知の部分も多く、血球系細胞の複雑な情報ネットワークに關与している未知の情報伝達分子が、まだ複数存在しているものと思われる。従って、リンパ球系細胞や造血系細胞で発現する新たなサイトカイン受容体を同定することは、このようなサイトカインのシグナル伝達の解明に留まらず、サイトカインが關与する種々の疾患に対する治療や予防の手段を開発する上でも極めて重要である。

発明の開示

本発明は、血球系細胞で発現する新規なサイトカイン受容体様タンパク質およびその遺伝子を提供することを課題とする。また、本発明は、該遺伝子が挿入されたベクター、該ベクターを保持する宿主細胞、該タンパク質に結合する抗体を提供することを課題とする。さらに、本発明は、該タンパク質を利用した、リガンドなどの該タンパク質に結合する化合物をスクリーニングする方法を提供することを課題とする。

本発明者らは、免疫・分化機能に關与する新たな因子若しくはその受容体のク

ローン化を目指し、独自に開発したシグナルシーケンストラップ (signal sequence trap; SST) 法 (特願平 9-324912 号) を利用して、分化誘導を行ったリンパ球由来のポリ A RNA を材料に、分泌・膜タンパク質をコードする cDNA のスクリーニングを行った。その結果、本発明者らは、I 型サイトカイン受容体スーパーファミリー (Miyajima, A. et al., Ann. Rev. Immunol. (1992) 10, 295-331) に属する受容体と相同性を有する新規な受容体様タンパク質をコードする遺伝子を単離することに成功した。この遺伝子は、マウス組織の心臓、肺、肝臓、脾臓で発現していた他、Ba/F3、DA-1、CTLL2 等の骨髓系・リンパ球系細胞株でも発現が見られた。また、該遺伝子がコードする蛋白質の膜近位領域は増殖シグナルの伝達および JAK2 の活性化においてヒト EPOR の膜近位領域の代わりとなることができた。

サイトカイン受容体スーパーファミリーはこれまで多数の、それぞれ機能の異なる分子が同定されており、いずれも生体で免疫系を中心として重要な役割を果たしていることが知られている。本発明の受容体様タンパク質は細胞内にシグナルを伝える box1・box2 領域と推測できる領域を持っており、遺伝子発現の組織・細胞特異性やその構造上の特徴から、該タンパク質が細胞における細胞外から細胞内へのシグナル伝達分子として、特に免疫系で機能することが示唆される。従って該タンパク質は、免疫・分化機能に関与する因子の精製やクローニング、さらには免疫機能関連疾患の医薬品候補化合物のスクリーニングのためのツールとして有用である。

本発明は血球系細胞で発現する新規な受容体様タンパク質およびその遺伝子並びにそれらの製造および用途に関し、より具体的には、

1. 下記 (a) から (d) のいずれかに記載の DNA、

(a) 配列番号：2 または 4 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA

(b) 配列番号：1 または 3 に記載の塩基配列のコード領域を含む DNA

(c) 配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA

(d) 配列番号：1または3に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA であって、配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA

2. (1) に記載の DNA が挿入されたベクター、
3. (2) に記載のベクターを保持する宿主細胞、
4. (1) に記載の DNA がコードするタンパク質、
5. (3) に記載の宿主細胞を培養し、該宿主細胞またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収する工程を含む、(4) に記載のタンパク質の製造方法、
6. (4) に記載のタンパク質に結合する抗体、
7. (4) に記載のタンパク質の部分ペプチド、
8. 配列番号：1または3に記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖とハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するヌクレオチド、
9. (4) に記載のタンパク質に結合する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、
 - (a) (4) に記載のタンパク質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、
 - (b) (4) に記載のタンパク質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法、
10. (9) に記載の方法により単離されうる、(4) に記載のタンパク質に結合する化合物、
11. 天然由来である、(10) に記載の化合物、

12. リガンド、アゴニスト、またはアンタゴニストである、(10)に記載の化合物、を提供するものである。

なお、本発明において、「リガンド」とは、細胞膜に発現する本発明のタンパク質に結合することにより、その機能を活性化するタンパク質を指す。

また、本発明において「アゴニスト」とは、本発明のタンパク質とリガンドとの結合と同様の現象（本発明のタンパク質の活性化）を引き起こすことができる、本発明のタンパク質に特異的に結合できる分子を指す。

また、「アンタゴニスト」とは、本発明のタンパク質に特異的に結合することによってその機能を抑制する分子を指す。

本発明は、血球系細胞で発現する新規なサイトカイン受容体様タンパク質を提供する。本発明者らにより単離された2つのマウス由来のcDNAの塩基配列をそれぞれ配列番号：1および3に、該cDNAによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：2および4に示す（図1参照）。これらのタンパク質は、I型サイトカイン受容体スーパーファミリーに属する既知のタンパク質と相同性を有しており、そのN末端にシグナル配列を持ち、配列番号：2に記載のタンパク質は中間部に膜貫通領域と予想される疎水性に富んだアミノ酸領域を有する（図2参照）。また、データベース上においては有意な相同性を示すアミノ酸配列を有するタンパク質は見出されなかった。従って、本発明者らにより見出されたタンパク質は、I型サイトカイン受容体スーパーファミリーに属する新規なタンパク質であると考えられる。また、該タンパク質の膜近位領域は増殖シグナルの伝達およびJAK2の活性化においてヒトEPORの膜近位領域の代わりとなることから、該タンパク質が、異種受容体との複合体形成により、JAK2の活性化を通じたシグナル伝達に関与していることが示唆される。

該タンパク質をコードする遺伝子は、リンパ球からクローニングされたことに加え、ノーザンブロット解析の結果、心臓、肺、肝臓、脾臓に発現が見られ、Ba/F3、DA-1、CTLL2等の骨髓系・リンパ球系細胞株でも発現が見られた。従って

、この受容体様タンパク質は、免疫や造血において調節的役割を果たしていることが考えられ、免疫系の機能に関連する因子の精製やクローニング、さらには免疫系関連疾患の治療薬候補化合物のスクリーニングなどのための有用なツールとして利用しうる。また、各種感染症・自己免疫疾患・腫瘍免疫における遺伝子治療などの治療に利用し得る。

本発明は、また、配列番号：2または4に記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質を包含する。

本発明において「機能的に同等」とは、対象となるタンパク質が受容体タンパク質として機能することを指す。配列番号：2に記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質は、好ましくはI型サイトカイン受容体としての特徴を有する。このような特徴としては、例えば box1 や box2 領域が挙げられる。box1 とは、サイトカイン受容体の膜近傍の細胞内領域に存在し、プロリンを多く含有する8アミノ酸からなる領域であり、box2 は、C末端よりに存在し、LEVL 配列を含む10アミノ酸からなる領域である。共に細胞内情報伝達に重要であると考えられているが、特に、box1 は、Jak (ヤヌスキナーゼ) とサイトカイン受容体との相互作用に重要と考えられる (Ning Jiang, J. Biol. Chem., 271, 16472-16476 (1996))。また、配列番号：4に記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質は、好ましくは可溶性サイトカイン受容体としての特徴を有する。可溶性サイトカイン受容体とは、細胞外領域のみからなるタンパク質であり、リガンドとの結合活性を有する限り細胞外領域全体であっても、細胞外領域の一部であってもよい。可溶性サイトカイン受容体は、その情報伝達経路により、リガンドの阻害剤にも促進剤にもなり得る (Smith, D.H., Science, 238, 1704-1707 (1987) ; Novick, D., Cytokine, 4, 6-11 (1992))。

機能的に同等なタンパク質を単離するための、当業者によく知られた方法としては、タンパク質に変異を導入する方法が知られている。例えば、当業者であれば、部位特異的変異誘発法 (Hashimoto-Gotoh, T, Mizuno, T, Ogasahara, Y,

and Nakagawa, M. (1995) An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. *Gene* 152, 271-275、Zoller, MJ, and Smith, M.(1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. *Methods Enzymol.* 100, 468-500、Kramer, W, Drutsa, V, Jansen, HW, Kramer, B, Pflugfelder, M, and Fritz, HJ (1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. *Nucleic Acids Res.* 12, 9441-9456、Kramer W, and Fritz HJ (1987)

Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA *Methods. Enzymol.* 154, 350-367、Kunkel, TA (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82, 488-492) などを用いて、配列番号：2または4のアミノ酸配列に適宜変異を導入することにより配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質を調製することができる。また、アミノ酸の変異は自然界においても生じうる。このように、配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が変異したアミノ酸配列を有し、配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。このような変異体における、変異するアミノ酸数は、通常、30アミノ酸以内であり、好ましくは、15アミノ酸以内であり、さらに好ましくは5アミノ酸以内であり、さらに好ましくは3アミノ酸以内であると考えられる。

また、変異するアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸 (A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、親水性アミノ酸 (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸 (G, A, V, L, I, P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸 (S, T, Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸 (C, M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸 (D、

N、E、Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸 (R、K、H)、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸 (H、F、Y、W) を挙げることができる (括弧内はいずれもアミノ酸の一字標記を表す)。

配列番号：2 または 4 に記載のタンパク質に 1 又は複数個のアミノ酸残基が付加された蛋白質としては、例えば、配列番号：2 または 4 に記載のタンパク質を含む融合蛋白質が挙げられる。融合蛋白質は、配列番号：2 または 4 に記載のタンパク質またはその部分ペプチドと他のペプチド又は蛋白質とが融合したものであり、本発明に含まれる。融合する他のペプチドとしては、タンパク質の精製や検出を容易にするためなどの目的で用いられるタグや他のサイトカイン受容体またはその部分ペプチド (図 5 参照) が挙げられる。融合蛋白質を作製する方法は、例えば、本発明のタンパク質をコードする DNA と他のペプチド又は蛋白質をコードする DNA をフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよく、当業者に公知の手法を用いることができる。本発明の蛋白質との融合に付される他のペプチド又は蛋白質としては、特に限定されない。

また、機能的に同等なタンパク質を単離する当業者によく知られた他の方法としては、ハイブリダイゼーション技術 (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989) を利用した方法が挙げられる。即ち、当業者であれば、配列番号：2 または 4 に記載のタンパク質をコードする DNA 配列 (それぞれ配列番号：1 または 3) もしくはその一部を基に、これと相同性の高い DNA を単離して、該 DNA から配列番号：2 または 4 に記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質を単離することも通常行いうることである。このように、配列番号：2 または 4 に記載のタンパク質をコードする DNA 配列もしくはその一部からなる DNA とハイブリダイズする DNA がコードするタンパク質であって、配列番号：2 または 4 に記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。このようなタンパ

ク質としては、例えば、マウス以外の哺乳動物のホモログ（例えば、ヒト遺伝子がコードするタンパク質）が挙げられる。

機能的に同等なタンパク質をコードする DNA を単離するためのハイブリダイゼーションは、例えば、ストリンジェンシーが、10%ホルムアミド、5xSSPE、1x デンハルト溶液、1x サケ精子 DNA の条件で行うことができる。より好ましい条件（よりストリンジェントな条件）としては、25%ホルムアミド、5xSSPE、1x デンハルト溶液、1x サケ精子 DNA の条件であり、さらに好ましい条件（さらにストリンジェントな条件）としては、50%ホルムアミド、5xSSPE、1x デンハルト溶液、1x サケ精子 DNA の条件である。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては上記ホルムアミド濃度以外にも複数考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。また、ハイブリダイゼーションにかえて、タンパク質をコードする DNA（配列番号：1または3）の一部をプライマーに用いる遺伝子増幅法、例えば、PCR 法を利用して単離することも可能である。

これらハイブリダイゼーション技術または遺伝子増幅技術により単離される DNA がコードする配列番号：2または4に記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質は、通常、配列番号：2または4に記載のタンパク質とアミノ酸配列において高い相同性を有する。高い相同性とは、通常、70%以上の相同性、好ましくは80%以上の相同性、さらに好ましくは95%以上の相同性である。蛋白質の相同性を決定するには、文献（Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730）に記載のアルゴリズムにしたがえばよい。

本発明のタンパク質は、当業者に公知の方法により、組み換えタンパク質として、また天然のタンパク質として調製することが可能である。組み換えタンパク質であれば、例えば、膜結合型と予想されるタンパク質であれば、該タンパク質の膜結合に必要な領域以外の部分を細胞外に分泌させる。次いで、この細胞の培

養上清を回収し、濃縮した後、イオン交換、逆相、ゲル濾過などのクロマトグラフィ、あるいは本発明のタンパク質に対する抗体をカラムに固定したアフィニティークロマトグラフィーにかけることにより、または、さらにこれらのカラムを複数組み合わせることにより精製することが可能である。また、本発明のタンパク質をグルタチオン S トランスフェラーゼタンパク質との融合タンパク質として、あるいはヒスチジンを複数付加させた組み換えタンパク質として宿主細胞（例えば、動物細胞や大腸菌など）内で発現させ、発現させた組み換えタンパク質をグルタチオンカラム、あるいはニッケルカラムにより精製する。その後、必要に応じて融合タンパク質のうち目的のタンパク質以外の領域を、トロンビンまたはファクターXa などにより切断し、除去する方法により調製できる。天然のタンパク質であれば、例えば、本発明のタンパク質を発現している細胞の抽出物に対し、後述する本発明の抗体が結合したアフィニティークラムを作用させて精製することにより単離することができる。

本発明は、また、本発明の蛋白質の部分ペプチドを包含する。本発明の部分ペプチドは、少なくとも 8 アミノ酸以上、好ましくは 15 アミノ酸以上、さらに好ましくは 50 アミノ酸以上（例えば、70 アミノ酸、100 アミノ酸、または 130 アミノ酸以上）のアミノ酸配列からなる。該部分ペプチドは、例えば、本発明の蛋白質に対する抗体の作製、本発明のタンパク質に結合するリガンドなどの化合物のスクリーニングや、本発明のタンパク質の競合阻害剤の調製などに利用し得る。本発明の部分ペプチドとしては、例えば、本発明のタンパク質からシグナルペプチドが除去された形態のタンパク質や細胞内の領域を除去した形態のタンパク質が含まれる。また、例えば、リガンドとの結合能を有するが細胞内へのシグナル伝達を行う能力のない部分ペプチド（本発明のタンパク質の競合阻害剤として機能する）が含まれる。本発明の部分ペプチドは、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明の蛋白質を適切なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。

また、本発明は、本発明のタンパク質をコードする DNA を提供する。本発明の DNA は、本発明のタンパク質をコードしうるものであれば、いかなる形態でもよい。即ち、mRNA から合成された cDNA であるか、ゲノム DNA であるか、化学合成 DNA であるかなどを問わない。また、本発明のタンパク質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有する DNA が含まれる。

本発明の DNA は、当業者に公知の方法により調製することができる。例えば、本発明のタンパク質を発現している細胞より cDNA ライブラリーを作製し、本発明の DNA の配列（例えば、配列番号：1 または 3 に記載の DNA 配列）の一部をプローブにしてハイブリダイゼーションを行うことにより調製できる。また、本発明のタンパク質を発現している細胞より RNA を調製し、本発明の DNA の配列（例えば、配列番号：1 または 3 に記載の DNA 配列）に基づいてオリゴ DNA を合成し、これをプライマーとして用いて PCR 反応を行い、本発明のタンパク質をコードする cDNA を増幅させることにより調製することも可能である。

本発明の DNA は、本発明のタンパク質を組み換えタンパク質として生産するために利用することができる。また、本発明のタンパク質をコードする DNA に欠陥がある場合には、アンチセンスによる機能阻害や、正常な遺伝子に置き換える遺伝子治療などへの応用も考えられる。

また、本発明は、本発明の DNA が挿入されたベクターを提供する。本発明のベクターとしては、宿主細胞内において本発明の DNA の発現させうるものであれば特に制限はない。例えば、宿主を大腸菌とする場合には、ベクターを大腸菌（例えば、JM109、DH5 α 、HB101、XL1Blue）などで大量に増幅させ大量調製するために、大腸菌で増幅されるための「ori」をもち、さらに形質転換された大腸菌の選抜遺伝子（例えば、なんらかの薬剤（アンピシリンやテトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール）により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有すれば特に制限はない。例えば、M13 系ベクター、pUC 系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Script などが挙げられる。また cDNA のサブクローニ

ング、切り出しを目的とした場合も上記ベクターの他に、pGEM-T、pDIRECT、pT7などがあげられる。本発明のタンパク質を生産する目的においてベクターを使用する場合には、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を持つほかに、宿主を JM109、DH5 α 、HB101、XL1Blue などの大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター（例えば、lac, T7 など）を持っていることが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他に pGEX、pEGFP、または pET（この場合、宿主は T7 RNA ポリメラーゼを発現している BL21 が好ましい）などが挙げられる。

また、CHO 細胞、COS 細胞、NIH3T3 細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター（SV40, MMLV-LTR, EF1 α , CMV プロモーターなど）を持っていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子（例えば、薬剤（ネオマイシン、G418 など）により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13 などが挙げられる。

さらに、細胞内でのコピー数の増幅を目的とした宿主ベクター系においては、安定産生細胞株の場合は、核酸合成経路を欠損した CHO 細胞にそれを相補する DHFR 遺伝子を有するベクター（例えば、pCHO1 など）を用いメトトレキセート（MTX）により増幅させる方法が挙げられ、また一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T 抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つ COS 細胞を用いて SV40 の複製機転を持つベクター（pcD など）で形質転換する方法が挙げられる。

一方、動物の生体内で本発明の DNA を発現させる方法としては、本発明の DNA を適当なベクターに組み込みレトロウイルス法、リボソーム法、カチオニックリボソーム法、アデノウイルス法などにより生体内に導入する方法などが挙げられる。用いられるベクターに特に制限はないが、pAdexlcw や pZIPneo などが挙げ

られる。ベクターへの本発明の DNA の挿入などの一般的な遺伝子操作は、常法に従って行うことが可能である (Molecular Cloning ,5.61-5.63)。

また、本発明は、本発明のベクターが導入された宿主細胞を提供する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、例えば、大腸菌や種々の動物細胞などを用いることが可能である。大腸菌では、例えば、JM109、DH 5 α 、HB101 等が挙げられ、動物細胞においては、例えば、CHO 細胞、COS 細胞、3T3 細胞、HeLa 細胞などが挙げられる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特に CHO 細胞が好ましい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAE デキストラン法、エレクトロポレーション、リポフェクションなどの方法で行うことが可能である。

また、本発明は、本発明のタンパク質と結合する抗体を提供する。本発明の抗体の形態には、特に制限はなく、ポリクローナル抗体の他、モノクローナル抗体も含まれる。また、ウサギなどに本発明のタンパク質を免疫して得た抗血清、すべてのクラスのポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、さらにヒト抗体や遺伝子組み換えによるヒト型化抗体も含まれる。

本発明の抗体は、以下の方法により調製することが可能である。ポリクローナル抗体であれば、例えば、本発明のタンパク質をウサギなどの小動物に免疫し血清を得て、これを本発明のタンパク質をカップリングさせたアフィニティーカラムにより、本発明のタンパク質のみを認識する画分を得て、さらにこの画分から免疫グロブリン G あるいは M を、プロテイン A、あるいはプロテイン G カラムにより精製することにより調製することができる。また、モノクローナル抗体であれば、本発明のタンパク質をマウスなどの小動物に免疫を行い、同マウスより脾臓を摘出し、これをすりつぶして細胞にし、マウスミエローマ細胞とポリエチレングリコールなどの試薬により融合させ、これによりできた融合細胞 (ハイブリドーマ) の中から、本発明のタンパク質に対する抗体を産生するクローンを選択する。次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより

腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテイン A、プロテイン G カラム、DEAE イオン交換クロマトグラフィー、本発明のタンパク質をカップリングしたアフィニティーカラムなどにより精製することで調製することが可能である。本発明の抗体は、本発明のタンパク質の精製、検出に用いられる他、本発明のタンパク質のアゴニストやアンタゴニストの候補になる。また、本発明の抗体を免疫関連疾患の抗体治療へ応用することも考えられる。抗体治療に用いる場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト抗体やヒト型抗体が好ましい。

また、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となる蛋白質、蛋白質発現細胞又はその溶解物を免疫して抗体産生細胞を取得し、これをミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマを用いて蛋白質に対するヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号 W092-03918、W093-2227、W094-02602、W094-25585、W096-33735 および W096-34096 参照）。

さらに、本発明の抗体は、本発明の蛋白質に結合するかぎり、その抗体断片や抗体修飾物であってよい。例えば、抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv 又は H 鎖と L 鎖の Fv を適当なリンカーで連結させたシングルチェーン Fv(scFv) (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883) が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137 参照）。

抗体修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本発明の「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

本発明はまた、配列番号：1 または 3 に示される塩基配列からなる DNA またはその相補鎖とハイブリダイズし、少なくとも 15 塩基の鎖長を有するヌクレオチドを提供する。このヌクレオチドは好ましくは配列番号：1 または 3 に示される塩基配列からなる DNA またはその相補鎖と特異的にハイブリダイズするものである。ここで「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、他の蛋白質をコードする DNA とのクロスハイブリダイゼーションが有意に生じないことを意味する。このようなヌクレオチドには、本発明のタンパク質をコードする DNA またはその相補鎖と特異的にハイブリダイズし得るプローブやプライマー、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイム等）が含まれる。

また、本発明は、本発明のタンパク質を利用した、本発明のタンパク質に結合する化合物のスクリーニング方法を提供する。

このスクリーニング方法は、(a) 本発明のタンパク質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、(b) 本発明のタンパク質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む。

スクリーニングに用いられる本発明の蛋白質は組換え型、天然型又は部分ペプチドのいずれであってもよい。また、精製した蛋白質やその部分ペプチドであっても、細胞表面に発現させた形態、膜画分としての形態であってもよい。また、被験試料としては特に制限はなく、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、タンパク質、ペプチド、合成低分子化合物が挙げられる。

本発明のタンパク質を用いて、該タンパク質に対するリガンドを単離する方法としては、当業者に公知の多くの方法を用いることが可能である。例えば、リガンドを発現していることが予想される細胞（例えば、T細胞など）よりファージベクター（ λ gt11, ZAP など）を用いた cDNA ライブラリーを作製し、これを L B-アガロース上で発現させフィルターに発現させたタンパク質を固定し、本発明のタンパク質をビオチンラベル、あるいは GST タンパク質との融合タンパク質として精製し、これを上記フィルターと反応させ、結合するタンパク質を発現しているプラークを、ストレプトアビジン、あるいは抗 GST 抗体により検出する「ウエストウエスタンブロッティング法」（Skolnik EY, Margolis B, Mohammadi M, Lowenstein E, Fischer R, Drepps A, Ullrich A, and Schlessinger J (1991)Cloning of PI3 kinase-associated p85 utilizing a novel method for expression/cloning of target proteins for receptor tyrosine kinases. Cell 65, 83-90) により調製することが可能である。また、本発明のタンパク質を SRF 結合領域または GAL4 結合領域と融合させて酵母細胞の中で発現させ、リガンドを発現していることが予想される細胞より、VP16 または GAL4 転写活性化領域と融合する形で発現するような cDNA ライブラリーを作製し、これを上記酵母細胞に導入し、検出された陽性クローンからライブラリー由来 cDNA を単離して大腸菌に導入して発現させる（酵母細胞内で本発明のタンパク質と結合するタンパク質が発現すると、両者の結合によりレポーター遺伝子が活性化され、陽性のクローンが確認できる）「two ハイブリッドシステム」（「MATCHMAKER Two-Hybrid System」, 「Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit」, 「MATCHMAKER One-Hybrid System」(いずれも clontech 社製)、「HybriZAP Two-Hybrid Vector System」(stratagene 社製)、文献「Dalton S, and Treisman R (1992)Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. Cell 68, 597-612」)に従い調製することも可能である。

また、本発明蛋白質と特異的に結合するリガンドのスクリーニングは、本発明蛋白質の細胞外ドメインとシグナル伝達能を有するヘモポエチン受容体などの既知の受容体蛋白質の細胞膜貫通ドメインを含む細胞内ドメインとを連結せしめて作製したキメラ受容体を、適当な細胞株、好ましくは適当な増殖因子の存在下でのみ生存および増殖可能な細胞株（増殖因子依存性細胞株）の細胞表面に発現せしめた後、該細胞株を種々の増殖因子、サイトカイン、または造血因子等を含むことが期待される材料を添加して培養することにより実施可能である。この方法は、被検材料中に本発明蛋白質の細胞外ドメインと特異的に結合するリガンドが存在する場合にのみ、上記増殖因子依存性細胞株が生存および増殖が可能であることを利用している。既知のヘモポエチン受容体としては、例えば、トロンボポエチン受容体、エリスロポエチン受容体、G-CSF 受容体、gp130 等が挙げられるが、本発明のスクリーニング系に用いるキメラ受容体のパートナーは、これら既知のヘモポエチン受容体に限定されるものではなく、細胞質ドメインにシグナル伝達活性に必要な構造を備えているものであれば何を用いても構わない。例えば、TNF 受容体スーパーファミリーに属する OX40 受容体をキメラ受容体のパートナーとして選択することができる (Mallet, S. et al., EMBO J. , 19, 1063-1068 (1990))。OX40 受容体は、細胞内に正のシグナルを伝達することができることから、増殖反応等を指標としてリガンドのスクリーニングを行うことができる (Baum, P.R. et al., EMBO J., 13, 3992-4001 (1994))。増殖因子依存性細胞株としては、例えば、BaF3 や FDC-P1 を初めとした IL3 依存性細胞株を利用することが可能である。

さらに、本発明のタンパク質を、そのリガンドを発現していない細胞で発現させ、次いで、該細胞に、リガンドを発現していることが予想される細胞より構築した発現 cDNA ライブラリーを COS などの細胞に導入して得た培養上清を添加し、そして該細胞のある種の変化（例えば増殖活性などの機能的変化または形態的变化を含む）を指標にリガンドを探索する「ダイレクト発現クローニング法」（

Yokota T, Otsuka T, Mosmann T, Banchereau J, DeFrance T, Blanchard D, De Vries JE, Lee F, and Arai K. (1986) Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B-cell stimulatory factor 1, that expresses B-cell- and T-cell-stimulating activities.

Proc Natl Acad Sci U S A. 83, 5894-5898) により調製することも可能である。これらのスクリーニング方法は、本発明のタンパク質に対する抗体や、本発明のタンパク質に結合する化合物を被検試料として用いたアゴニストやアンタゴニストのスクリーニングに用いることも可能である。

さらにまた、本発明のタンパク質を固定したアフィニティーカラムに本発明のリガンドを発現していることが予想される細胞の培養上清をのせ、カラムに特異的に結合するタンパク質を精製することにより調製することも可能である。得られたタンパク質（リガンド）のアミノ酸配列を分析し、それを基にオリゴ DNA を合成し、該 DNA をプローブとして cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、該リガンドをコードする DNA を得ることが可能である。

さらにまた、本発明の蛋白質の細胞外領域と、抗体（例えばヒト IgG 抗体）の Fc 領域とのキメラ蛋白質として発現し、プロテイン A カラム等を用いて精製することができる。このような抗体様キメラ蛋白質は、リガンドの結合活性を有することから、適宜、放射性同位元素等で標識した後、リガンドのスクリーニングに用いることができる（Suda, T. et al., Cell, 175, 1169-1178 (1993)）。また、TNF ファミリー分子などのある種のサイトカインでは、その多くが膜結合型でも存在することから、各種の細胞と抗体様キメラ蛋白質を反応させて、結合活性を示した細胞から、リガンドを単離する事ができる可能性もある。また、cDNA ライブラリーを導入した細胞を用いて同様にリガンドを単離することができる。さらに、抗体様キメラ蛋白質をアンタゴニストとして用いることも可能である。

また、本発明のタンパク質を用いて、該タンパク質に対するアゴニスト、およ

びアンタゴニストを単離する方法としては、例えば、固定した本発明のタンパク質に、化合物、または天然物バンク、もしくはランダムファージペプチドディスプレイライブラリーを作用させ、結合する分子をスクリーニングする方法や、コンビナトリアルケミストリー技術によるハイスループットを用いたスクリーニング方法 (Wrighton NC; Farrell FX; Chang R; Kashyap AK; Barbone FP; Mulcahy LS; Johnson DL; Barrett RW; Jolliffe LK; Dower WJ., Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin, Science (UNITED STATES) Jul 26 1996, 273 p458-64, Verdine GL., The combinatorial chemistry of nature. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p11-13, Hogan JC Jr., Directed combinatorial chemistry. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p17-9) が当業者に公知である。

これにより単離されたりガンド、アゴニスト、アンタゴニストは、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害するための薬剤の候補となり、本発明のタンパク質が関与する疾患（例えば、免疫系関連疾患）の治療への応用が考えられる。

本発明のスクリーニング法により単離される化合物を、薬剤として用いる場合には、公知の製剤学的製造法により製剤化して用いることが可能である。例えば、薬理学上許容される担体または媒体（生理食塩水、植物油、懸濁剤、界面活性剤、安定剤など）とともに患者に投与される。投与は、化合物の性質に応じて、経皮的、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、静脈内、または経口的に行われると考えられる。投与量は、患者の年齢、体重、症状、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択することが可能である。

例えば、本発明の蛋白質と結合活性を有する化合物の投与量は、症状により差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重 60kg として）においては、1 日あたり約 0.1 から 100mg、好ましくは約 1.0 から 50mg、より好ましくは約 1.0 から 20mg である。

非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投

与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重 60kg として）においては、1 日あたり約 0.01 から 30mg、好ましくは約 0.1 から 20mg、より好ましくは約 0.1 から 10mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重 60kg 当たりに換算した量、あるいは、体表面積あたりに換算した量を投与することができる。

図面の簡単な説明

図 1 は、クローニングした Delta1 cDNA の塩基配列および推定アミノ酸配列を示す図である。右端の数字はヌクレオチド位置を示す。太い下線は推定シグナル配列および膜貫通領域を示す。細い下線はボックス 1 およびボックス 2 領域を示す。囲った領域は WSXWS ボックス様配列である。

図 2 は、Delta1 とその他の既知のサイトカイン受容体との同一性および類似性を示す図である。

(A) Delta1 およびマウス共通 γ 受容体 (γc) の細胞外ドメインの配置。

(B) 様々な造血増殖因子受容体の配列の比較。Delta1 とその他の受容体のアミノ酸残基のマッチを「*」（同一）または「:」（類似）によって示す。これまでに定義された相同性領域、相同性ボックス 1 および 2 と呼ばれる領域を示す。ボックス 1 およびボックス 2 は、I 型サイトカイン受容体の膜近位領域 (Mura kami M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:11349(1991)) において認められる短い特徴的なモチーフである。ボックス 1 モチーフは、疎水性配列の後に続く PXP モチーフ（プロリン、X、プロリン）によって定義される。ボックス 2 はいくつかの陰性荷電アミノ酸を有する疎水性アミノ酸の集団として定義される。

図 3 は、マウス組織における Delta1 の発現を示す写真である。RNA 分子量マーカーの移動度をキロベースで示す。

図 4 は、マウス多組織プロットのノザンプロットハイブリダイゼーションを示す写真である。RNA 分子量マーカーの移動度をキロベースで示す。

図5は、キメラ受容体の構造を示す図である。野生型 Delta1 および EPOR をキメラ EPO-Delta1R、hEDER、および hMPL-Delta1R と共に略図で示す。融合したドメインは同種の cDNA 内で産生された制限部位によって示す。

図6は、FDC-P1 トランスフェクタントの因子反応性を示す図である。様々な受容体構築物によってレトロウイルスによって形質導入した FDC-P1 細胞増殖の経時的变化を示した。

図7は、FDC-P1 細胞において異所発現させたキメラ EDER を通じての JAK2 キナーゼの活性化を示す写真である。

図8は、Ba/F3 細胞上に発現させた、タグを付した Delta1 の免疫沈降を示す写真である。Delta1-Flag の位置（矢印の先）および分子量マーカールを示す。

図9は、マウス第5染色体の中心領域における Delta1 のマップを示す。種間戻し交雑分析によって Delta1 はマウス第5染色体上に位置した。全ての座に関してタイピングした戻し交雑動物 106 例における Delta1 と隣接遺伝子の分離パターンを図の上部に示す。それぞれのカラムは、(C57BL/6J × M. スプレッス (M. spretus)) F1 親から受け継いだ戻し交雑子孫において同定された染色体を表す。影をつけた枠は C57BL/6J 対立遺伝子の存在を示し、白い枠は M. スプレッス対立遺伝子の存在を示す。それぞれのタイプの染色体を受け継いでいる子孫の数をそれぞれのカラムの下に記載する。連鎖遺伝子に関連して Delta1 の位置を示す部分的第5染色体連鎖マップを図の下に示す。センチモルガンで示す座間の組換え距離を染色体の左側に示し、本試験において引用した座の位置は GDB (ゲノムデータベース)、すなわちジョーンズ・ホプキンス大学 (メリーランド州、バルチモア) のウィリアム H. ウェルチメディカルライブラリによって維持されているヒト連鎖情報のコンピューターデータベースから得ることができる。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制

限されるものではない。

〔実施例 1〕 シグナルシーケンスストラップ (SST)法によるリンパ球 cDNA ライブラリーのスクリーニング

マウスオボアルブミン (OVA) のアミノ酸 323~339 に特異的な T 細胞レセプターのトランスジェニックマウス、OVA-23-3 は既に確立されている (Sato ら, 1994, Eur. J. Immunol., vol.24, p.1512)。OVA-23-3 マウスの脾臓細胞を OVA323-339 ペプチド、抗原提示細胞、インターロイキン 2、インターロイキン 12 及び抗インターロイキン 4 モノクローナル抗体存在下で培養する事により、Th1 型のサイトカインを分泌するリンパ球に分化し、また OVA323-339 ペプチド、抗原提示細胞、インターロイキン 2、インターロイキン 4 及び抗インターロイキン 12 モノクローナル抗体存在下で培養する事により Th2 型のサイトカインを分泌するリンパ球に分化することが既に示されている (Ohta ら, 1997, Journal of Immunological Methods, vol.209, p.85)。

そこで、上記の Ohta らの方法により Th1 型、Th2 型に分化させたリンパ球より Fast Track(Invitrogen)を用いて polyA(+)RNA を調製した。SuperScript Choice System(GIBCO BRL)のランダムヘキサマーを用いて二本鎖 cDNA を合成した。cDNA の末端平滑処理後 BstXI アダプター(Invitrogen)を付加し、SizeSep 400 Spun Column(Pharmacia)を用いて 400bp 以上の cDNA を分画した。別に BstXI (宝酒造) 及び BAP 処理した pMX GM(-)v-mpl^{M2} (特願平 9-324912 号参照) と混合後 T4 DNA ligase を作用させて連結した。これを Gene Pulser (Bio Rad)を用いて電気穿孔法にて大腸菌 DH10B (GIBCO BRL)に導入して cDNA ライブラリーを構築した。

ライブラリー組換え大腸菌から抽出したプラスミドを JETstar カラム (GENOMED)を用いて精製した。パッケージング細胞 BOSC23(Proc. Natl. Acad. Sci. U SA, vol.90: 8392-8396, 1993)に LipofectAMINE (LIFE TECHNOLOGIES)を用いてプラスミド cDNA ラブラリーをトランスフェクトした。BOSC23 を 10%ウシ胎

児血清 (FCS, JRH BIOSCIENCES)を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, LIFE TECHNOLOGIES)で 6cm dish (Corning)に播き込み 16 時間後、DMEM で洗浄し、先に 200 μ l DMEM で希釈した 18 μ l LipofectAMINE と 200 μ l DMEM で希釈したプラスミド 3 μ g を混ぜて 15 分間室温で放置したものに 1.6ml DMEM を混ぜて細胞に加えた。5 時間後 2ml の 20%FCS を含む DMEM を加え 19 時間培養した。その後 3ml の 10% FCS を含む DMEM に置換し 24 時間後にその培養上清を回収した。この組み換えウイルスを含む培養上清にマウス interleukin-3(IL-3) 及び 10 μ g/ml hexadimethrine bromide を加え、これに Ba/F3 細胞を懸濁して感染させた。感染させて 24 時間後細胞をリン酸緩衝液にて 3 回洗浄し 10%FCS を含む RPMI1640 にて培養を続けた。

IL-3 非存在下で増殖してきたクローンから染色体 DNA を抽出し、cDNA 挿入部位を挟むように設定したプライマー (5'-gggggtggaccatcctcta-3' /配列番号 : 5、および 5'-cgcgagctgtaaacggtag-3' /配列番号 : 6) を用いて PCR を行い cDNA 断片を回収した。PCR は 500ng 染色体 DNA、500pM 各プライマー、TaKaRa L A Taq (宝酒造) 2.5 単位、2.5mM MgCl₂、0.3mM dNTPs 及び酵素添付緩衝液を含む反応液 50 μ l について GeneAmpPCR System 2400 で以下の条件にて行った。98 °C、60 秒の變成後、「98°C, 20 秒、68°C, 120 秒」のサイクルを 30 回行った。PCR 反応物をアガロース電気泳動にかけ増幅された断片を含む部分を切り出し、DNA を精製した。得られた DNA 断片についての塩基配列を決定したところ、I 型サイトカイン受容体スーパーファミリー受容体と相同性を有するサイトカイン受容体様タンパク質をコードする cDNA の一部であることが明らかとなった。

[実施例 2] 全長 cDNA のクローニングと塩基配列決定

完全長 cDNA を得るために Th2 型リンパ球 cDNA ライブラリーを oligo dT プライマーで合成し、上記 cDNA 断片をプローブにスクリーニングした。具体的には Th2 型リンパ球 polyA(+)RNA から SuperScript Choice System (GIBCO BRL)の oligo dT プライマーを用いて二本鎖 cDNA を合成した。cDNA の末端平滑処理後 Bs

tXI アダプター(Invitrogen)を付加し、SizeSep 400 Spun Column (Pharmacia)を用いて 400bp 以上の cDNA を分画した。別に BstXI(宝酒造) 及び BAP 処理した pME 18s (Liu, Y.C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90(19), 8957-8961 (1993)) と混合後 T4 DNA ligase を作用させて連結した。これを Gene Pulser (Bio Rad)を用いて電気穿孔法にて大腸菌 DH10B (GIBCO BRL)に導入して cDNA ライブラリーを構築した。ライブラリー組換え大腸菌から抽出したプラスミドを JETstar カラム(GENOMED)を用いて精製した。

先に SST 法にて得られた DNA 断片 $0.1\mu\text{g}$ を鋳型にその内部プライマー(50pmole) (22115; 5'-ggtgatgtcacagtcgtctgccatg-3'/配列番号: 7、および 22113; 5'-acgggtccgcaggagtagcagtaa-3'/配列番号: 8)、2.5mM MgCl_2 、0.2mM dATP, dGTP, dCTP、0.1mM dTTP、10 μM Biotine-21-dUTP、2.5 単位 TaKaRa LA Taq (宝酒造) 及び酵素添付緩衝液を含む反応液 50 μl について GeneAmpPCR System 2400 で 98°C、60 秒の変成後、「98°C、20 秒、59°C、20 秒、74°C、60 秒」のサイクルを 30 回行いビオチン化した。このビオチン化 DNA 100ng を含む 14.9 μl 水溶液を 100°C 5 分変成急冷後、2mM CoCl_2 、30mM TrisHCl pH8.0、8mM MgCl_2 、1.6mM ATP[γS]、80 μM ATP (それぞれ最終濃度) 及び 4 μg recA を加え、37°C 15 分間保温後上記プラスミド cDNA ライブラリーを 5 μg 加え(最終容量 30 μl)更に 20 分間保温した。HindIII 消化 λ DNA を 50ng 加え 5 分後、10%SDS を 0.6 μl 、14mg/ml ProteinaseK を 0.4 μl 加え 10 分間保温後 50mM PMSF を 2 μl 加えて反応を停止させた。ここに鮭精巢 DNA で blocking 処理した Streptavidin M agneSphere (Promega)を加え、20 分間吸着させた。0.05% Tween20 を含む 10mM TrisHCl pH7.5, 1mM EDTA, 1M NaCl で 1 回、10mM TrisHCl pH7.5, 1mM EDTA, 2M NaCl で 3 回洗浄後、さらに蒸留水で 1 回洗浄し 1mM EDTA, 0.1N NaOH で DNA を溶出させた。

これをエタノール沈殿後 Gene Pulser (Bio Rad)を用いて電気穿孔法にて大腸菌 DH10B (GIBCO BRL)に導入し、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン含有培地上にて組み

換え体を選択した。

得られたコロニーからプラスミドを抽出し、上記の *recA* 反応を再度行い、アンピシリン含有培地上にて組み換え体を選択した。上記の 221L5 及び 221L3 を用いて同様の条件にてコロニーPCRを行った。約 400 塩基のバンドが得られた陽性コロニーからプラスミドを抽出して挿入 cDNA の塩基配列を決定した。

上記操作により 2 種類のクローンが得られ、一方(「Delta1」と称する)は 1278 塩基の cDNA(配列番号：1) が得られ、359 アミノ酸残基(配列番号：2) をコードするオープンリーディングフレーム(59～1135 位)が認められた。1～24 アミノ酸がシグナル配列、231～253 アミノ酸が膜貫通ドメインと推定される。また細胞外ドメインについては、IL-2 γ 等の I 型サイトカイン受容体スーパーファミリーで保存されているシステイン、WS ボックス(201～205 アミノ酸)領域等について比較的高い相同性を示した。また細胞内ドメインについては 262～269 アミノ酸、311～322 アミノ酸がそれぞれ box1・box2 と呼ばれるサイトカイン受容体に共通で、シグナル伝達に重要と推測されている構造との相同性を示した。また、Delta1 は、国際公開番号 W099/47538 に記載のタンパク質と相同性を示した。

もう一方(「215S」と称する)は 804 塩基(配列番号：3) よりなり、188 アミノ酸残基(配列番号：4) をコードするオープンリーディングフレーム(98～661 位)が認められた。シグナル配列以下 175 アミノ酸までは全く 215L と相同であるが、膜貫通ドメイン以下に相当する部位を欠失しており、各種サイトカインレセプターに多く見られる可溶型と考えられた。

[実施例 3] ノーザンブロッティング

マウスの多組織ノーザンブロット(クロンテック・ラボラトリーズ)を、上記のプライマーセットを用いて作製した 407 bp のデルタ 1 特異的 PCR 断片をプローブとして調べた。50%ホルムアミド、5 \times SSC、1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、6 \times デンハート試薬、および 100 μ g/ml サケ精子 DNA 中で、ブロット

を ^{32}P -標識ランダムプライミングプローブと 42°C で一晩ハイブリダイズさせ、 $0.1\times\text{SSC}$ 、 0.1% SDS 中で 55°C で洗浄して、その後 X 線フィルムに露光した。ファストトラック 2.0 キット（インビトロゲン社）を用いて様々なマウス細胞株から調製したポリ(A)+RNA 試料 ($3\mu\text{g}$) を、 1% アガロースホルムアミドゲルによる電気泳動によって分離して、ハイボンド N+（アマシャム社）ナイロンフィルターに移した。上記プローブを用いてハイブリダイズし、その後洗浄した。

ノーザンブロットの結果、 1.4 キロベース (kb) の単一の転写物が、調べた全ての骨髓細胞株、CTLL、ならびに休止期および活性化マウス Th1 および Th2 細胞において同定されたが、NIH3T3 細胞を含む繊維芽細胞株 2 株では同定されなかった。Th2 分化誘導細胞は Th1 分化誘導細胞よりかなり高い発現を示した。T 細胞活性化による発現のわずかなアップレギュレーションがいずれの T 細胞培養においても認められた（図 3）。多数の組織のノーザンブロット分析において、心臓、脳、脾臓、肺、腎臓および精巣では 1.4 キロベース (kb) の単転写物が同定されたが、骨格筋では同定されなかった（図 4）。

【実施例 4】 Delta1 の機能的分析

本発明者等は、まず、IL-3 または IL-4 にそれぞれ反応して増殖または生存する Ba/F3 細胞において Delta1 の過剰発現を行なった。しかしながら、Delta1 が過剰発現してもこれらのサイトカインに対する Ba/F3 反応は増強しなかった。その上、これらのサイトカインは、Delta1 を過剰発現する Ba/F3 細胞において Delta1-Flag のチロシンリン酸化を誘導せず、このことは Delta1 が IL-3 および IL-4 シグナル伝達に関与していないことを示唆している（データは示していない）。

次に、本発明者等は、Delta1 の細胞質ドメインの機能を調べた。Delta1 と hE POR または hMPL の間のキメラ受容体を作製して Delta1 の細胞質ドメインのホモダイマー形成が及ぼす影響を調べた。ボックス 1 を含む Delta1 の膜近位領域の

機能を評価するために、hEPOR の膜近位領域を Delta1 の膜近位領域と置換することによって EDER キメラを作製した。

キメラ受容体の構築および発現は、次のように行なった。野生型 hEPOR を発現させるため、完全長の hEPOR (Noguchi CT. et al., Blood 78:2548(1991)) を、pMX-puro レトロウイルスベクターの EcoRI および Not I 部位にクローニングした (Onishi M. et al., Mol.Cell.Biol.18:3871(1998))。キメラ受容体 hEPOR-Delta1R および hMPL-Delta1R を構築する場合には、EcoRI 部位をそれぞれの cDNA の細胞外ドメインと膜貫通ドメインの間に挿入した。次に、高精度 DNA ポリメラーゼ Pyrobest (タカラ) を用いた PCR によって得られた Delta1 cDNA の細胞質ドメインを、5'-EcoRI および 3'-NotI 部位で pMX-puro にクローニングし、hEPOR または hMPL (Vigon I. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:5640(1992)) の細胞外ドメインを含む EcoRI 断片を 5'-EcoRI 部位にクローニングした (図 5)。Delta1 cDNA において EcoRI および Not I 部位の作製に、プライマーとして、5'-aaagaattccccctctgcccctgggc-3' / 配列番号 : 9 および 5'-gctggcggccgcacctgcaggcgc-3' / 配列番号 : 10 を用いた。hEPOR cDNA における EcoRI 部位の作製に、プライマーとして、5'-aaagaattcgggggtgtatcatggac-3' / 配列番号 : 11 および 5'-aaagaattcgggtccaggtcgctagg-3' / 配列番号 : 12 を用いた。hMPL cDNA における EcoRI 部位の作製に、プライマーとして、5'-ggtagggaaattccgaatttctctcgagatg-3' / 配列番号 : 13 および 5'-aaagaattcccaggcgggtctcgtggcgggt-3' / 配列番号 : 14 を用いた。キメラ受容体 EDER を構築するために、hEPOR の膜貫通ドメインおよびボックス I 領域をカバーするアミノ酸 57 個の枝を Delta1 の対応する領域と置換した。まず、HpaI 部位を細胞外ドメインと膜貫通ドメインの間に挿入し、XhoI 部位を、hEPOR の細胞質ドメインにおいて保存されたトリプトファン残基の下流に挿入した (図 5)。次に、Delta1 cDNA のボックス I 領域を pMX-puro の EcoRI および Not I 部位にクローニングした。その後 hEPOR の細胞質ドメインを EcoRI および Not I 部位にクローニングし、hEPOR

の細胞外ドメインを EcoRI および HpaI 部位にクローニングした。膜貫通領域および膜近位領域に及ぶ Delta cDNA の末端で 5'-EcoRI および HpaI 部位、ならびに 3'-XhoI 部位および Not I 部位を作製するために、プライマーとして、5'-aaagaattcgttaaccgcgccctcctgccctgggg-3' / 配列番号 : 15 および 5'-aaagcgccgcctcgagccaggcctggaagtccc-3' / 配列番号 : 16 を用いた。hEPOR の細胞質領域において 5'-XhoI および 3'-Not I 部位を作製するために、プライマーとして、5'-aaactcgagctgtaccagaatgatggc-3' / 配列番号 : 17 並びに 5'-aaagcgccgctcacttgtcagagcaagccacatagct-3'、5'-aaagcgccgctcagtcctcagagcaagccacatagct-3'、5'-aaagcgccgctcagtccttagagcaagccacatagct-3'、および 5'-aaagcgccgctcagtaatcagagcaagccacatagct-3' / 配列番号 : 18 から 21 を用いた。hEPOR の細胞外領域における 5'-EcoRI および 3'-HpaI 部位の作製に、プライマーとして、5'-aaagaattcgggggctgtatcatggac-3' / 配列番号 : 22 および 5'-aaagttaacggggtccaggtcgctagg-3' / 配列番号 : 23 を用いた。全ての構築物は制限酵素分析およびシーケンシングによって確認した。

得られた発現プラスミドを、記述通りに (Kitamura T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:9146(1995)) レトロウイルス感染によって FDC-P1 に導入した。感染した細胞株は安定なトランスフェクタントを得るために 1 μ g/ml ピューロマイシン (シグマ社) の存在下で選択した。

親の FDC-P1 および hEPOR、hEPOR-Delta1R、EDER、および hMPL-Delta1R を発現する FDC-P1 細胞は、1ng/ml mIL-3、2U/ml hEPO、2U/ml hEPO、2U/ml hEPO、および 100 ng/ml hTPO の存在下でそれぞれ培養し、表示の時点で細胞数を計数した。

その結果、マイトゲン特性に関しては、EDER を発現する FDC-P1 細胞は hEPO に反応して効率よく増殖した (図 6) のに対し、キメラ受容体 hEPO-Delta1R または hMPL-Delta1R を発現する FDC-P1 細胞は、EPO または TPO に反応してそれぞれ増殖シグナルを伝達しなかった。

〔実施例 5〕 EDE キメラ受容体による JAK キナーゼのリン酸化

キメラ受容体 EDER が JAK キナーゼの hEPO 依存的活性化を媒介するか否かを、JAK2 に対する抗体による免疫沈降、およびホスホチロシンに対する抗体（モノクローナル抗体 4G10）によるウェスタンブロッティングによってアッセイした。ストリッピングの後、抗 JAK 抗体を用いて再度解析を行なった。抗 JAK1、抗 JAK3 および抗 Tyk-2 抗体を用いて同様の分析を実施した。

免疫沈降およびウェスタンブロッティングは、次のように行なった。細胞を溶解緩衝液（50 mM トリス塩酸（pH 7.5）、150 mM NaCl、1% トライトン X-100、1 mM EDTA、0.2 mM Na_3VO_4 、2 mM PMSF）中で溶解した。12,000×g で 40 分間遠心することによって溶解物からゴミを除去してきれいにし、上清を抗体と共に 4℃ で 2 時間インキュベートした。免疫複合体をプロテイン A セファロース（ファルマシア社）によって沈殿させ、溶解緩衝液で洗浄し、蛋白質を SDS-PAGE のために同じ緩衝液（62.5 mM トリス塩酸（pH 6.8）、2% SDS、10% グリセロール、5% 2-メルカプトエタノール、0.02% ブロモフェノールブルー）で溶出した。溶出した蛋白質を 8～16% 勾配のゲル上で電気泳動した（グラディポア社、オーストラリアのノースライド）。膜を抗体またはストレプトアビジン・ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ（HRPO）（ベクターラボラトリーズ）をプローブとして調べ、強化化学発光検出システム（アマシャム社）を用いて製造元のマニュアルに従って可視化した。

EDER のマイトゲン活性は、JAK キナーゼが hEPO 誘導二量体形成によって活性化されることが示唆された。実際に、ウェスタンブロット分析によって、EDER を発現する細胞において hEPO-依存的 JAK2 リン酸化が検出された（図 7）。EDER を発現する細胞では hEPO 刺激に反応して JAK1、JAK3 および TYK2 をリン酸化しなかった。4 個の JAK はいずれもキメラ受容体 hEPO-Delta1R または hMPL-Delta1R をそれぞれ発現する細胞において EPO または TPO 刺激に反応してリン酸化

されなかった（データは示していない）。

〔実施例 6〕 Delta1 蛋白質の発現

タグを付した Delta1 を構築するため、Flag 配列（DYKDDDDK/配列番号：24）を Delta1 の C-末端と融合することによって Delta1-Flag をデザインした。Delta1-Flag の PCR 断片を 5'-EcoRI 部位および 3'-Not I 部位で pMX-puro レトロウイルスベクターにクローニングした。Delta1 の C 末端に Flag 配列を加えるために、プライマーとして、5'-agggaattccggaatttcctcgagatc-3'/配列番号：25 および 5'-aaagcggccgctcacttgctgctcatgctccttgtaatccagggtcatgtagccgctgtc-3'/配列番号：26 を用いた。

構築されたベクターは、レトロウイルス感染によって Ba/F3 細胞に導入した。タグをつけた Delta1 によって形質導入した Ba/F3 細胞および親細胞をスルホ-NHS-LC ビオチンで表面標識し、細胞溶解物を抗 Flag 抗体によって沈降させ、次にストレプトアビジン-HRP0 によるブロッティングを行った（図 8）。発現された Delta1 蛋白質は分子量 50 kDa であり、これは計算した分子量 37791 ダルトンより大きかった。この差はおそらく糖部分が、Delta1 の細胞外ドメインに認められる予想される 2 つの N-結合グリコシル化部位と思われる部位のいくつかと結合したためである。

〔実施例 7〕 染色体の位置

F1 (C57BL/6J×M. スプレッス (M. spretus)) の雌と C57BL/6J の雄を交雑させることによって種間戻し交雑子孫を作製した (Copeland NG., Jenkins NA., Trends Genet 7:113(1991))。N2 マウスを全体で 205 匹用いて Delta1 座をマッピングした。DNA 単離、制限酵素消化、アガロースゲル電気泳動、サザンブロットトランスファー、およびハイブリダイゼーションは本質的に記述通り (Jenkins NA. et al., J Virol 43:26(1982)) に実施した。全てのプロットをハイボンド

N+ナイロンメンブレン（アマシャム社、イリノイ州アーリントン・ハイツ）によって調製した。マウス cDNA の 407 bp 断片であるプローブを、ランダムプライミング標識キット（ストラタジーン社）を用いて、 $[\alpha^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ によって標識した；洗浄は最終的なストリンジェンシー $1.0 \times \text{SSCP}$ 、0.1% SDS、65°C で実施した。C57BL/6J および M. スプレッス (M. spretus) DNA をいくつかの酵素によって消化して、マウス cDNA Delta1 プローブを用いて、情報の多い制限断片長多形 (RFLP) を得るためにサザンブロットハイブリダイゼーションによる分析を行なった。8.7 kb または 11.0 kb の ScaI 断片を C57BL/6J DNA または M. スプレッス (M. spretus) DNA においてそれぞれ検出した。11.0 kb ScaI M. スプレッス特異的断片の有無を戻し交雑マウスにおいて追跡した。

Fgf5、Dmp1、Gfi1 および Crybb2 を含む Delta1 に連鎖したプローブと RFLP に関する記述はこれまでに報告されている (Liao X. et al., J Virol 69:7132(1995)、George A. et al., J Biol Chem 271:32869(1996))。組換えの距離はマップマネージャー、バージョン 2.6.5. を用いて計算した。遺伝子の順序は対立遺伝子分布パターンを説明するために必要な組換えイベントの数を最小限にすることによって決定した。

マッピングの結果は、Delta1 が Fgf5、Dmp1、Gfi1 および Crybb2 と連鎖してマウス第 5 染色体の中心領域に位置することを示した。マウス 106 匹について分離分析においてあらゆるマーカーを分析して示したが (図 9)、いくつかのマーカー対に関するタイピングは 154 匹までのマウスについて行った。それぞれの座を、さらなるデータを用いて組換え頻度に関して対として組合せて分析した。それぞれの座の対に関して分析したマウスの総数に対する組換え染色体を示したマウスの総数の比および最も可能性が高い遺伝子順序は、「セントロメア-Fgf5-4/151-Dmp1-0/136-Delta1-Gfi1-4/145-Crybb2」であった。組換え頻度 [センチモルガン (cM) で表した遺伝子の距離 \pm 標準誤差] は、「セントロメア-Fgf5- 2.7 ± 1.3 - [Dmp1、Delta1、Gfi1] - 2.8 ± 1.4 - Crybb2」である。

普通にタイピングしたマウス 136 匹では、Dmp1 と Delta1 の間に、またはマウス 154 匹では Delta1 と Gfi1 の間には組換えは検出されず、このことは各対における 2 つの座は互いにそれぞれ 2.2 および 1.9 cM の範囲内に存在することを示唆している（95%信頼区間上限）。

産業上の利用の可能性

本発明により、サイトカイン受容体スーパーファミリーに属すると考えられる新規なサイトカイン受容体様タンパク質およびそれらの遺伝子が提供された。サイトカイン受容体スーパーファミリーはこれまで多数の、それぞれ機能の異なる分子が同定されており、いずれも生体で免疫系を中心として重要な役割を果たしていることが知られている。従って、本発明のタンパク質や遺伝子は、免疫・分化機能に関与する新たな因子の精製やクローニング、さらには医薬品候補化合物のスクリーニングのための有用なツールとして利用しうる。

請求の範囲

1. 下記 (a) から (d) のいずれかに記載の DNA。

(a) 配列番号：2 または 4 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA。

(b) 配列番号：1 または 3 に記載の塩基配列のコード領域を含む DNA。

(c) 配列番号：2 または 4 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、配列番号：2 または 4 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA。

(d) 配列番号：1 または 3 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA であって、配列番号：2 または 4 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA。

2. 請求項 1 に記載の DNA が挿入されたベクター。

3. 請求項 2 に記載のベクターを保持する宿主細胞。

4. 請求項 1 に記載の DNA がコードするタンパク質。

5. 請求項 3 に記載の宿主細胞を培養し、該宿主細胞またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収する工程を含む、請求項 4 に記載のタンパク質の製造方法。

6. 請求項 4 に記載のタンパク質に結合する抗体。

7. 請求項 4 に記載のタンパク質の部分ペプチド。

8. 配列番号：1 または 3 に記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖とハイブリダイズし、少なくとも 15 塩基の鎖長を有するヌクレオチド。

9. 請求項 4 に記載のタンパク質に結合する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 請求項 4 に記載のタンパク質またはその部分ペプチドに被検試料を接触さ

せる工程、

(b) 請求項 4 に記載のタンパク質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法。

10. 請求項 9 に記載の方法により単離されうる、請求項 4 に記載のタンパク質に結合する化合物。

11. 天然由来である、請求項 10 に記載の化合物。

12. リガンド、アゴニスト、またはアンタゴニストである、請求項 10 に記載の化合物。

[X] 1

accggctcggaccgaaccagctgtcaatcactgcagcgtccgcgccccgcggcgacAT 60
GGCATGGGCACTCGCGGTCATCCTCCTGCCTCGGCTCCTTACGGCGGCAGCGGCGGCGGC 120
A W A L A V I L L P R L L T A A A A A A
GGCGGTGACGTCACGGGGTGATGTCACAGTCGTCTGCCATGACCTGGAGACGGTGGAGGT 180
A V T S R G D V T V V C H D L E T V E V
CACGTGGGGCTCGGGCCCCGACCACCACGGCGCCAACCTTGAGCCTGGAGTTCGGTTATGG 240
T W G S G P D H H G A N L S L E F R Y G
TACTGGCGCCCTGCAACCCTGCCCGGATATTTCTGTCCGGCGCTGGTGTCACTTCCGG 300
T G A L Q P C P R Y F L S G A G V T S G
GTGCATCCTCCCCCGGGCGAGGGCGGGGCTGCTGGAGCTGGCACTGCGCGACGGAGGCGG 360
C I L P A A R A G L L E L A L R D G G G
GGCCATGGTGTTTAAGGCTAGGCAGCGCGCGTCCGCTGGCTGAAGCCCCGCCACCTTG 420
A M V F K A R Q R A S A W L K P R P P W
GAATGTGACGCTGCTCTGGACACCAGACGGGGACGTGACTGTCTCCTGGCCTGCCCACTC 480
N V T L L W T P D G D V T V S W P A H S
CTACCTGGGCCTGGACTACGAGGTGCAGCACCAGGAGCAATGACGATGAGGACGCCTG 540
Y L G L D Y E V Q H R E S N D D E D A W
GCAGACGACCTCAGGGCCCTGCTGTGACTTGACAGTGGGCGGGCTCGACCCCGCGCGCTG 600
Q T T S G P C C D L T V G G L D P A R C
CTATGACTTCCGGGTTCCGGGCGTCGCCCCGGGCGCGCACTATGGCCTGGAGGCGCAGCC 660
Y D F R V R A S P R A A H Y G L E A Q P
TAGCGAGTGGACAGCGGTGACAAGGCTTTCCGGGGCAGCATCCGCGGCTCCTGTACCGC 720
S E W T A V T R L S G A A S A A S C T A
AAGCCCCGCCCATCCCCGGCCCTGGCCCCGGCCCTCCTGCCCCCTGGGCTGCGGCCTAGC 780
S P A P S P A L A P P L L P L G C G L A
AGCGCTGCTGACACTGTCCCTGCTCCTGGCCGCCCTGAGGCTTCGAGGGTGAAAGATGC 840
A L L T L S L L L A A L R L R R V K D A
GCTGCTGCCCTGCGTCCCTGACCCAGCGGCTCCTTCCCTGGACTCTTTGAGAAGCATCA 900
L L P C V P D P S G S F P G L F E K H H
CGGGAACCTCCAGGCCTGGATTGCGGACGCCCAGGCCACAGCCCCGCCAGCCAGGACCGA 960
G N F Q A W I A D A Q A T A P P A R T E
GGAGGAAGATGACCTCATCCACCCCAAGGCTAAGAGGGTGGAGCCCGAGGACGGCACCTC 1020
E E D D L I H P K A K R V E P E D G T S
CCTCTGCACCGTGCCAAGGCCACCCAGCTTCGAGCCAAGGGGGCCGGAGGCGGGGCCAT 1080
L C T V P R P P S F E P R G P G G G A M
GGTGTCAGTGGGCGGGGCCACGTTTCATGGTGGGCGACAGCGGCTACATGACCCTGTGAcc 1140
V S V G G A T F M V G D S G Y M T L *
ttgaagtcaactgccagttctatacttcaggctgaggtcacttcctgtcttttaataattca 1200
aactcacaaatcctgtgcctgtctgtatgcaaatgtggtcacgaatattcaataaaatg 1260
caaatgctatgctaaaaa 1278



2 / 9

図 2

A

Deltal: MAWALAVILLPRLLTAAAAAAVTSRG 27

m γ _C : MLKLLSPRSFLVLQLLLLRAGWSSKVLMSANEDIKADLILTSTAPEHLSAPTLPLP 58

Deltal: DVTVVCHDLETVEVTWGSQPDHGANLSLEFRY---GTGALQPPRYFLSGAGVTSQIL 84
 +V ++E + TW S + NL+L +RY Q C Y S +TSQ +

m γ _C : EVQCFVFNIEYMNCTWNSSEPPQATNLTLYRYKVSNDNTFQESHYLS-KEITSQOI 117

Deltal: PAARAGLLELALRDGGGAMVFKARQASAWLK-----PRPPWNVTLLWTPDGDVTVSWP 138
 + L + K ++RA L PR P N+TL + + + W

m γ _C : QKEDIQLYQTFVVLQDPQ--KPQRAVQKLNQLNVLIPRAPENLTLSNLSQLELRWK 175

Deltal: AHSYLG--LDYEVQHRESNDDAWQTTSGPCCDLTVGGDLPARCYDFRVRASPRAAHYG 196
 + L Y VQ+R SN D + ++ +D + Y FRVR+ G

m γ _C : SRHIKERCLQYLQYR-SNRDRSWTELIVNHEPRFSLPSVDELKRYTFRVRSRYNPI-CG 233

Deltal: LEAQPSEWTAVTRLGAASAASCTASPAPSPALA 230
 Q S+W+

m γ _C : SSQQWSKWSQPVHWGSHTVEEN 255

B

Deltal	LLPCVPDPSCSFPGLFEKHGNGFQAWIA (19AA)	PKAKRVEPEDGTSLCT
	: * : * * * * * * * * * * :	: *
mEPOR	IWPGIPSPSEFEGLFTTHKGNFQLWLL (16AA)	DPPAHLEVLSEPRWAV
	* : * * * * * * * * * * :	* : * * * * *
mIL-2RB	LKCHIPDPSEFFSQLSSQHGGDLQKWS (14AA)	PEISPLEVLDGDSKAV
	: * * * * * *	: * * *
m γ p130	IWPVPDPSPSKSHIAQ-----WSP (20AA)	TDVSVVEIEANNKKPC
	: * * * *	: * * :
AIC2B	WKEKIPNPSKSLLFQDGGKGL---WPP (34AA)	NNVSPLTIEDPNIIRV

Box1 領域

保存トリプトファン

Box2 領域



3 / 9

図 3

β-アクチン

1.9 -



1.9 -



6.6 -
5.0 -
3.6 -
2.6 -
1.9 -
1.4 -
0.96 -
0.62 -

Delta1

Ba/F3

FDC-P1

CTLL

LG

32D

休止期 Th1

休止期 Th2

活性化 Th1

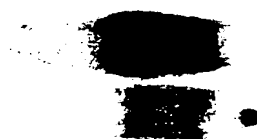
活性化 Th2

6.6 -
5.0 -
3.6 -
2.6 -
1.9 -
1.4 -
0.96 -
0.62 -

NIH3T3

LGM

30R





4 / 9

図 4

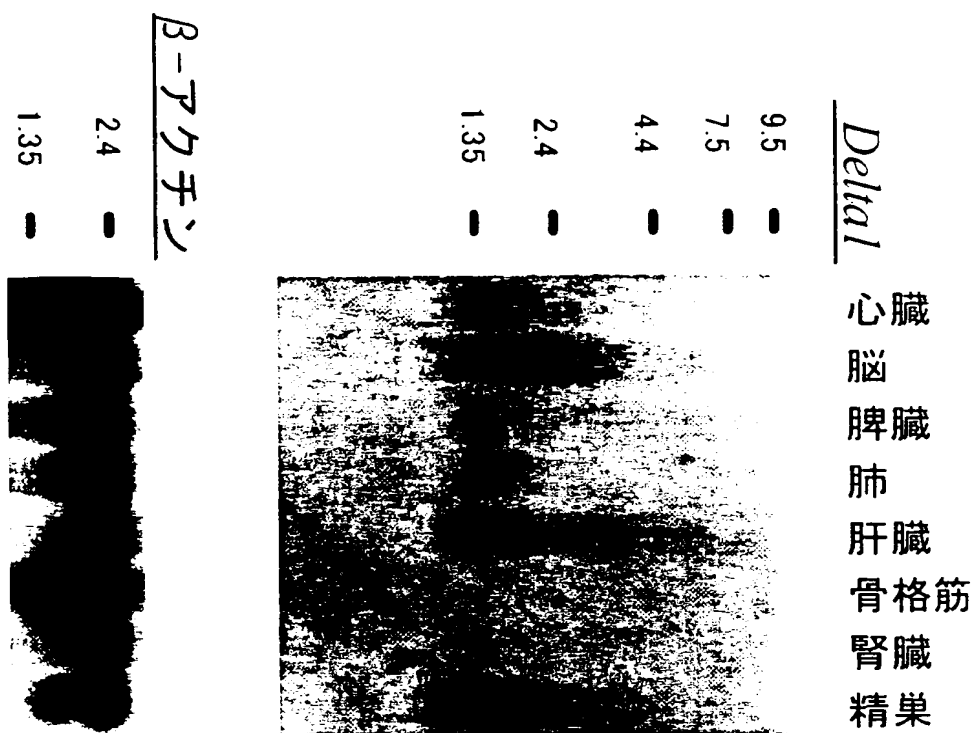
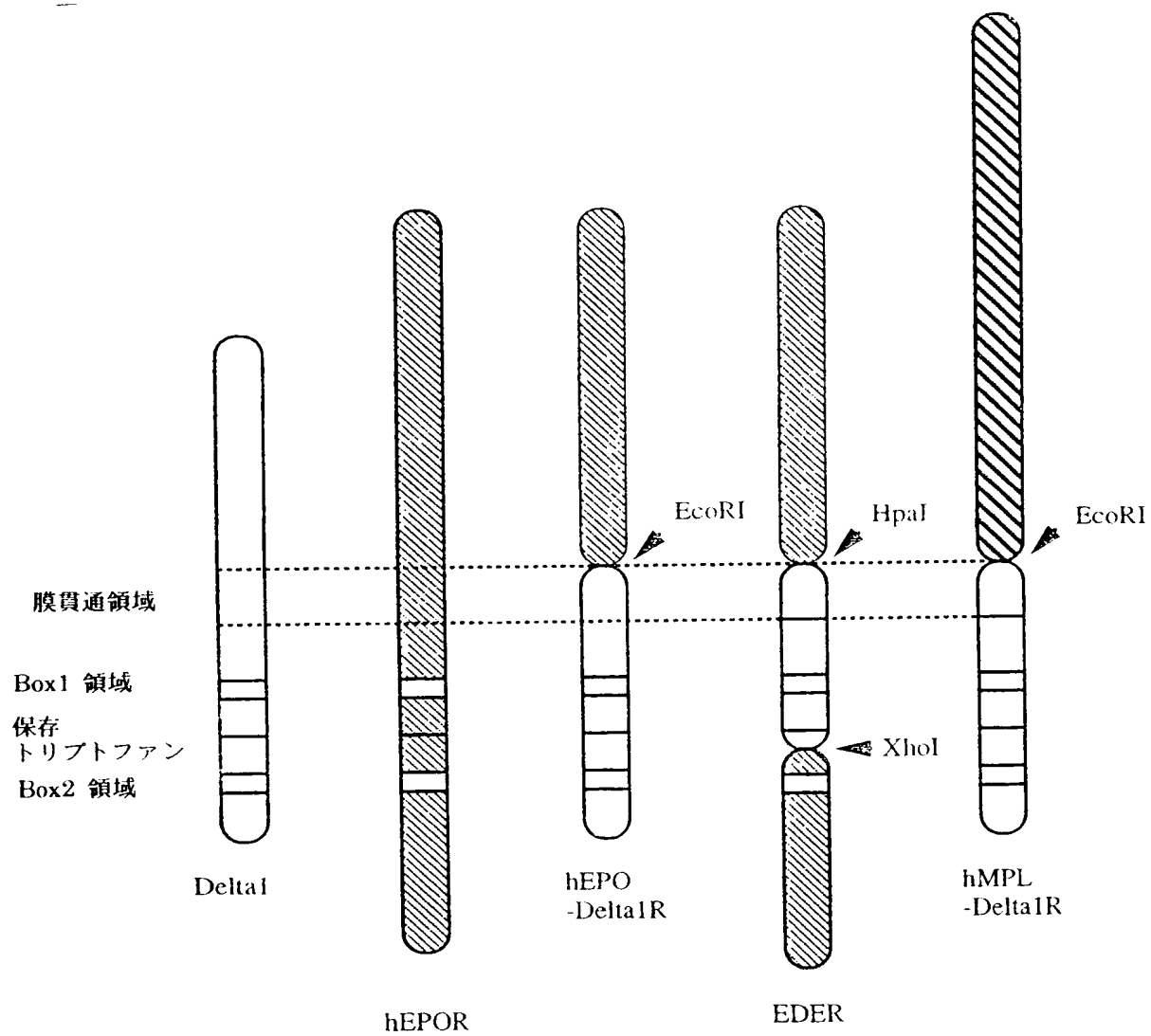




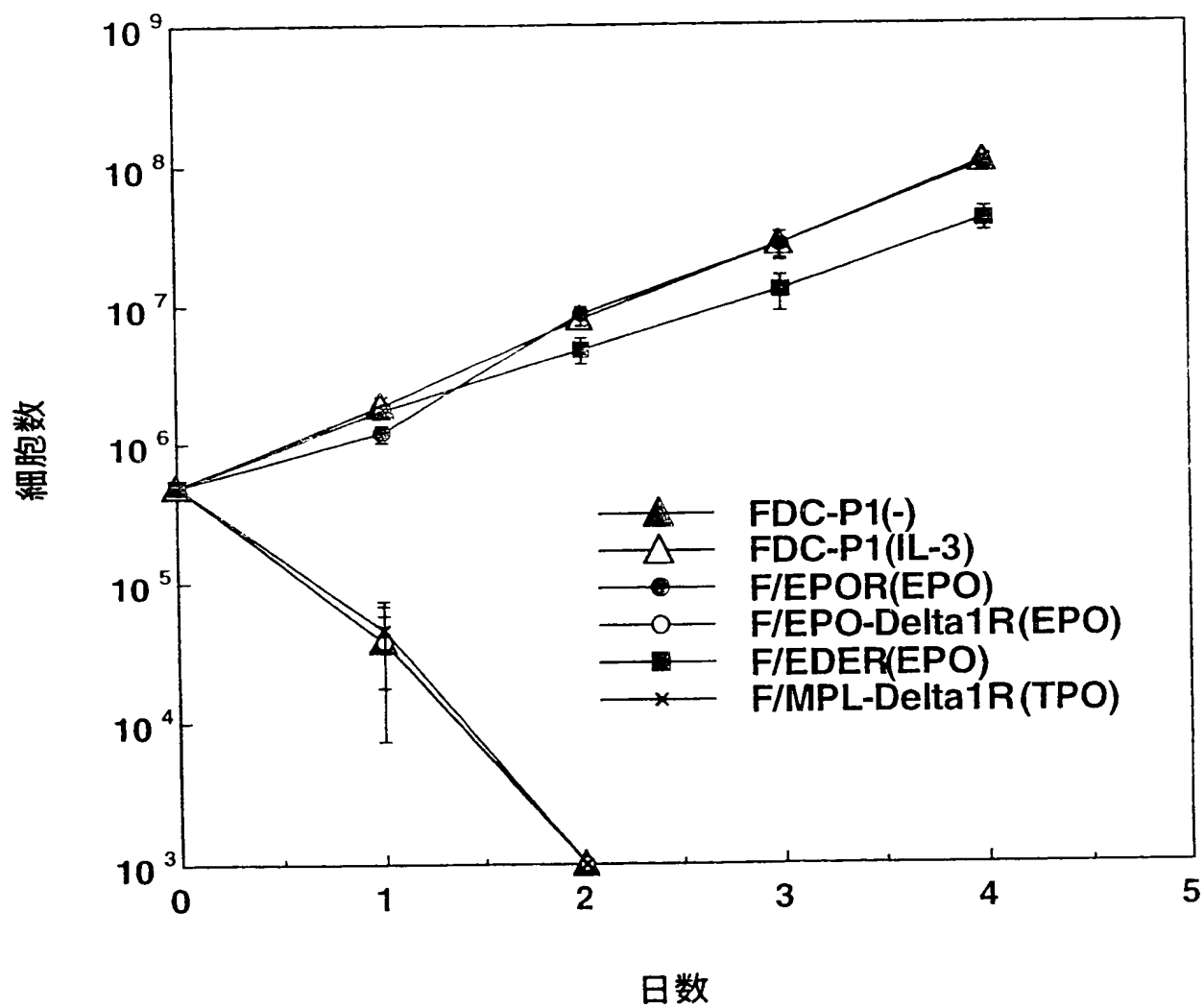
図 5





6 / 9

図 6







8 / 9

図 8

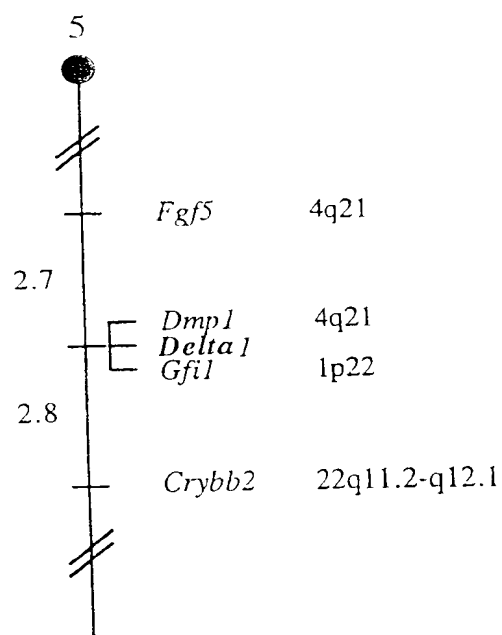
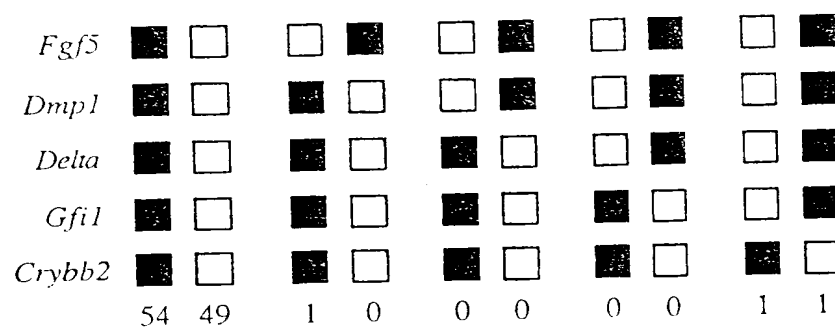


IP : 抗-Flag
ブロット : アビジン-HRPO



9 / 9

図 9





配列表

SEQUENCE LISTING

<110> KITAMURA, Toshio

<120> Cytokine receptor-like proteins

<130> C1-102PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-041936

<151> 1999-02-19

<160> 26

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1278

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>



<221> CDS

<222> -(59)..(1135)

<400> 1

accggtcgg accgaaccag ctgtcaatca ctgcagcgtc cgcgcccccg ccggcgac 58

atg gca tgg gca ctc gcg gtc atc ctc ctg cct cgg ctc ctt acg gcg 106

Met Ala Trp Ala Leu Ala Val Ile Leu Leu Pro Arg Leu Leu Thr Ala

1 5 10 15

gca gcg gcg gcg gcg gcg gtg acg tca cgg ggt gat gtc aca gtc gtc 154

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Val Thr Ser Arg Gly Asp Val Thr Val Val

20 25 30

tgc cat gac ctg gag acg gtg gag gtc acg tgg ggc tcg ggc ccc gac 202

Cys His Asp Leu Glu Thr Val Glu Val Thr Trp Gly Ser Gly Pro Asp

35 40 45

cac cac ggc gcc aac ttg agc ctg gag ttc cgt tat ggt act ggc gcc 250

His His Gly Ala Asn Leu Ser Leu Glu Phe Arg Tyr Gly Thr Gly Ala

50 55 60

ctg caa ccc tgc ccg cga tat ttc ctg tcc ggc gct ggt gtc act tcc 298

Leu Gln Pro Cys Pro Arg Tyr Phe Leu Ser Gly Ala Gly Val Thr Ser

65 70 75 80



ggg tgc atc ctc ccc gcg gcg agg gcg ggg ctg ctg gag ctg gca ctg 346

Gly Cys Ile Leu Pro Ala Ala Arg Ala Gly Leu Leu Glu Leu Ala Leu

85

90

95

cgc gac gga ggc ggg gcc atg gtg ttt aag gct agg cag cgc gcg tcc 394

Arg Asp Gly Gly Gly Ala Met Val Phe Lys Ala Arg Gln Arg Ala Ser

100

105

110

gcc tgg ctg aag ccc cgc cca cct tgg aat gtg acg ctg ctc tgg aca 442

Ala Trp Leu Lys Pro Arg Pro Pro Trp Asn Val Thr Leu Leu Trp Thr

115

120

125

cca gac ggg gac gtg act gtc tcc tgg cct gcc cac tcc tac ctg ggc 490

Pro Asp Gly Asp Val Thr Val Ser Trp Pro Ala His Ser Tyr Leu Gly

130

135

140

ctg gac tac gag gtg cag cac cgg gag agc aat gac gat gag gac gcc 538

Leu Asp Tyr Glu Val Gln His Arg Glu Ser Asn Asp Asp Glu Asp Ala

145

150

155

160

tgg cag acg acc tca ggg ccc tgc tgt gac ttg aca gtg ggc ggg ctc 586

Trp Gln Thr Thr Ser Gly Pro Cys Cys Asp Leu Thr Val Gly Gly Leu

165

170

175

gac ccc gcg cgc tgc tat gac ttc cgg gtt cgg gcg tgc ccc cgg gcc 634

Asp Pro Ala Arg Cys Tyr Asp Phe Arg Val Arg Ala Ser Pro Arg Ala



180	185	190	
gcg cac tat ggc ctg gag gcg cag cct agc gag tgg aca gcg gtg aca 682			
Ala His Tyr Gly Leu Glu Ala Gln Pro Ser Glu Trp Thr Ala Val Thr			
195	200	205	
agg ctt tcc ggg gca gca tcc gcg gcc tcc tgt acc gca agc ccc gcc 730			
Arg Leu Ser Gly Ala Ala Ser Ala Ala Ser Cys Thr Ala Ser Pro Ala			
210	215	220	
cca tcc ccg gcc ctg gcc ccg ccc ctc ctg ccc ctg ggc tgc ggc cta 778			
Pro Ser Pro Ala Leu Ala Pro Pro Leu Leu Pro Leu Gly Cys Gly Leu			
225	230	235	240
gca gcg ctg ctg aca ctg tcc ctg ctc ctg gcc gcc ctg agg ctt cgc 826			
Ala Ala Leu Leu Thr Leu Ser Leu Leu Leu Ala Ala Leu Arg Leu Arg			
245	250	255	
agg gtg aaa gat gcg ctg ctg ccc tgc gtc cct gac ccc agc ggc tcc 874			
Arg Val Lys Asp Ala Leu Leu Pro Cys Val Pro Asp Pro Ser Gly Ser			
260	265	270	
ttc cct gga ctc ttt gag aag cat cac ggg aac ttc cag gcc tgg att 922			
Phe Pro Gly Leu Phe Glu Lys His His Gly Asn Phe Gln Ala Trp Ile			
275	280	285	



geg gac gcc cag gcc aca gcc ccg cca gcc agg acc gag gag gaa gat 970

Ala Asp Ala Gln Ala Thr Ala Pro Pro Ala Arg Thr Glu Glu Glu Asp

290

295

300

gac ctc atc cac ccc aag gct aag agg gtg gag ccc gag gac ggc acc 1018

Asp Leu Ile His Pro Lys Ala Lys Arg Val Glu Pro Glu Asp Gly Thr

305

310

315

320

tcc ctc tgc acc gtg cca agg cca ccc agc ttc gag cca agg ggg ccg 1066

Ser Leu Cys Thr Val Pro Arg Pro Pro Ser Phe Glu Pro Arg Gly Pro

325

330

335

gga ggc ggg gcc atg gtg tca gtg ggc ggg gcc acg ttc atg gtg ggc 1114

Gly Gly Gly Ala Met Val Ser Val Gly Gly Ala Thr Phe Met Val Gly

340

345

350

gac agc ggc tac atg acc ctg tgacctgaa gtcactgcca gtctatactt 1165

Asp Ser Gly Tyr Met Thr Leu

355

caggctgagg tcacttctg tctttaaata attcaaacte acaaatcctg tgcctgtctg 1225

tatgcaaag tggtcagaa tattcaaata aaatgcaaat gctatgctaa aaa 1278



<211> 359

<212> _PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Ala Trp Ala Leu Ala Val Ile Leu Leu Pro Arg Leu Leu Thr Ala

1 5 10 15

Ala Ala Ala Ala Ala Val Thr Ser Arg Gly Asp Val Thr Val Val

20 25 30

Cys His Asp Leu Glu Thr Val Glu Val Thr Trp Gly Ser Gly Pro Asp

35 40 45

His His Gly Ala Asn Leu Ser Leu Glu Phe Arg Tyr Gly Thr Gly Ala

50 55 60

Leu Gln Pro Cys Pro Arg Tyr Phe Leu Ser Gly Ala Gly Val Thr Ser

65 70 75 80

Gly Cys Ile Leu Pro Ala Ala Arg Ala Gly Leu Leu Glu Leu Ala Leu

85 90 95

Arg Asp Gly Gly Gly Ala Met Val Phe Lys Ala Arg Gln Arg Ala Ser

100 105 110



Ala Trp Leu Lys Pro Arg Pro Pro Trp Asn Val Thr Leu Leu Trp Thr

— 115

120

125

Pro Asp Gly Asp Val Thr Val Ser Trp Pro Ala His Ser Tyr Leu Gly

130

135

140

Leu Asp Tyr Glu Val Gln His Arg Glu Ser Asn Asp Asp Glu Asp Ala

145

150

155

160

Trp Gln Thr Thr Ser Gly Pro Cys Cys Asp Leu Thr Val Gly Gly Leu

165

170

175

Asp Pro Ala Arg Cys Tyr Asp Phe Arg Val Arg Ala Ser Pro Arg Ala

180

185

190

Ala His Tyr Gly Leu Glu Ala Gln Pro Ser Glu Trp Thr Ala Val Thr

195

200

205

Arg Leu Ser Gly Ala Ala Ser Ala Ala Ser Cys Thr Ala Ser Pro Ala

210

215

220

Pro Ser Pro Ala Leu Ala Pro Pro Leu Leu Pro Leu Gly Cys Gly Leu

225

230

235

240

Ala Ala Leu Leu Thr Leu Ser Leu Leu Leu Ala Ala Leu Arg Leu Arg

245

250

255



Arg Val Lys Asp Ala Leu Leu Pro Cys Val Pro Asp Pro Ser Gly Ser

260

265

270

Phe Pro Gly Leu Phe Glu Lys His His Gly Asn Phe Gln Ala Trp Ile

275

280

285

Ala Asp Ala Gln Ala Thr Ala Pro Pro Ala Arg Thr Glu Glu Glu Asp

290

295

300

Asp Leu Ile His Pro Lys Ala Lys Arg Val Glu Pro Glu Asp Gly Thr

305

310

315

320

Ser Leu Cys Thr Val Pro Arg Pro Pro Ser Phe Glu Pro Arg Gly Pro

325

330

335

Gly Gly Gly Ala Met Val Ser Val Gly Gly Ala Thr Phe Met Val Gly

340

345

350

Asp Ser Gly Tyr Met Thr Leu

355

<210> 3

<211> 804

<212> DNA



<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (98)..(661)

<400> 3

cgttttcggc tctaagcggc ctgggcgccc tcgactcgga ccggetcgga ccgaaccagc 60

tgtaatcac tgcagcgtec gggcccccgc cggcgac atg gca tgg gca ctc gcg 115

Met Ala Trp Ala Leu Ala

1

5

gtc atc ctc ctg cct cgg ctc ctt acg gcg gca gcg gcg gcg gcg gcg 163

Val Ile Leu Leu Pro Arg Leu Leu Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala

10

15

20

gtg acg tca cgg ggt gat gtc aca gtc gtc tgc cat gac ctg gag acg 211

Val Thr Ser Arg Gly Asp Val Thr Val Val Cys His Asp Leu Glu Thr

25

30

35

gtg gag gtc acg tgg ggc tcg ggc ccc gac cac cac ggc gcc aac ttg 259

Val Glu Val Thr Trp Gly Ser Gly Pro Asp His His Gly Ala Asn Leu

40

45

50

agc ctg gag ttc cgt tat ggt act ggc gcc ctg caa ccc tgc ccg cga 307



Ser Leu Glu Phe Arg Tyr Gly Thr Gly Ala Leu Gln Pro Cys Pro Arg

55 — 60 65 70

tat ttc ctg tcc ggc gct ggt gtc act tcc ggg tgc atc ctc ccc gcg 355

Tyr Phe Leu Ser Gly Ala Gly Val Thr Ser Gly Cys Ile Leu Pro Ala

75 80 85

gcg agg gcg ggg ctg ctg gag ctg gca ctg cgc gac gga ggc ggg gcc 403

Ala Arg Ala Gly Leu Leu Glu Leu Ala Leu Arg Asp Gly Gly Gly Ala

90 95 100

atg gtg ttt aag gct agg cag cgc gcg tcc gcc tgg ctg aag ccc cgc 451

Met Val Phe Lys Ala Arg Gln Arg Ala Ser Ala Trp Leu Lys Pro Arg

105 110 115

cca cct tgg aat gtg acg ctg ctc tgg aca cca gac ggg gac gtg act 499

Pro Pro Trp Asn Val Thr Leu Leu Trp Thr Pro Asp Gly Asp Val Thr

120 125 130

gtc tcc tgg cct gcc cac tcc tac ctg ggc ctg gac tac gag gtg cag 547

Val Ser Trp Pro Ala His Ser Tyr Leu Gly Leu Asp Tyr Glu Val Gln

135 140 145 150

cac cgg gag agc aat gac gat gag gac gcc tgg cag acg acc tca ggg 595

His Arg Glu Ser Asn Asp Asp Glu Asp Ala Trp Gln Thr Thr Ser Gly

155 160 165



ccc tgc tgt gac ttg aca gtg ggc ggg gcc acg ttc atg gtg ggc gac 643
Pro Cys Cys Asp Leu Thr Val Gly Gly Ala Thr Phe Met Val Gly Asp
170 175 180

agc ggc tac atg acc ctg tgaccttgaa gtcactgcca gtctatactt 691
Ser Gly Tyr Met Thr Leu
185

caggetgagg tcacttctg tctttaaata attcaaactc acaaactctg tgctgtctg 751

tatgcaaatg tggtcacgaa tattcaaata aaatgcaaat gctatgctaa aaa 804

<210> 4

<211> 188

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Ala Trp Ala Leu Ala Val Ile Leu Leu Pro Arg Leu Leu Thr Ala
1 5 10 15

Ala Ala Ala Ala Ala Val Thr Ser Arg Gly Asp Val Thr Val Val
20 25 30



Cys His Asp Leu Glu Thr Val Glu Val Thr Trp Gly Ser Gly Pro Asp

— 35

40

45

His His Gly Ala Asn Leu Ser Leu Glu Phe Arg Tyr Gly Thr Gly Ala

50

55

60

Leu Gln Pro Cys Pro Arg Tyr Phe Leu Ser Gly Ala Gly Val Thr Ser

65

70

75

80

Gly Cys Ile Leu Pro Ala Ala Arg Ala Gly Leu Leu Glu Leu Ala Leu

85

90

95

Arg Asp Gly Gly Gly Ala Met Val Phe Lys Ala Arg Gln Arg Ala Ser

100

105

110

Ala Trp Leu Lys Pro Arg Pro Pro Trp Asn Val Thr Leu Leu Trp Thr

115

120

125

Pro Asp Gly Asp Val Thr Val Ser Trp Pro Ala His Ser Tyr Leu Gly

130

135

140

Leu Asp Tyr Glu Val Gln His Arg Glu Ser Asn Asp Asp Glu Asp Ala

145

150

155

160

Trp Gln Thr Thr Ser Gly Pro Cys Cys Asp Leu Thr Val Gly Gly Ala

165

170

175



Thr Phe Met Val Gly Asp Ser Gly Tyr Met Thr Leu

180

185

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 5

gggggtggac catcctcta

19

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence



<400> 6

cgcgagctg taaacggtg

20

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 7

ggtgatgtca cagtcgtctg ccatg

25

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence



<400> 8

acgggtccgca ggagtagcag taa

23

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 9

aaagaattcc cgccctcct gccctgggc

30

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence



<400> -10

gctggcggcc gcacctgcag gcgc

24

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 11

aaagaattcg ggggctgtat catggac

27

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence



<400> 12

aaagaattcg ggggccaggt cgctagg

27

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 13

ggtagggaat tccggaattt cctcgagatg

30

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence



<400> 14

aaagaattcc caggcgggtct cgggtggcggt

30

<210> 15

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 15

aaagaattcg ttaacccgcc cctcctgccc ctgggg

36

<210> 16

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence



<400> 16

aaagcggcgc cctcgagcca ggctggaag tccc

35

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 17

aaactcgagc tgtaccagaa tgatggc

27

<210> 18

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence



<400> 18

aaagcggcgcg ctcacttgtc agagcaagcc acatagct

38

<210> 19

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 19

aaagcggcgcg ctcagtcacg agagcaagcc acatagct

38

<210> 20

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence



<400> 20

aaagcggccg ctcagtcctt agagcaagcc acatagct

38

<210> 21

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 21

aaagcggccg ctcagtaatc agagcaagcc acatagct

38

<210> 22

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence



<400> 22

aaagaattcg ggggctgtat catggac

27

<210> 23

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 23

aaagttaacg ggggccaggt cgctagg

27

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Designed peptide sequence

<400> 24



Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 — 5

<210> 25

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence

<400> 25

agggaattcc ggaatttcct cgagatc

27

<210> 26

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized primer sequence



<400> 26

aaagcggcgc ctcacttgtc gtcacgtgcc ttgtaatcca gggtcacgta gccgctgctc 59



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00939

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, 5/10, 1/15, 1/19, 1/21, C12P21/02,
C07K14/715, 16/28, G01N33/53, 33/15, 33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00-90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GENBANK/EMBL/DBBJ/GENESEQ
PIR/SWISSPROT/GENESEQ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Biochemical and Biophysical Research Communication, 193(1), May 28 1993, Satoru Kumaki et al., "Cloning of the mouse interleukin 2 receptor γ chain: demonstration of functional differences between the mouse and human receptors", p.356-363	1-12
A	Experimental Hematology, 19(9), Oct. 1991 Karen Ehrenman et al., "The erythropoietin receptor gene: Cloning and identification of multiple transcripts in an Erythroid Cell Line OCIM1", p.973-977	1-12
A	Blood, 78(10), Nov. 15 1991 Constance Tom Noguchi et al., "Cloning of the human erythropoietin receptor gene", p.2548-2556	1-12
A	US, 5378808, A (GENETICS INST INC), 03 January, 1995 (03.01.95), Fig. 2 (Family: none)	1-12
P, A	WO, 99/47538, A1 (HUMAN GENOME SCI INC), 23 September, 1999 (23.09.99), p.134-135 (Family: none)	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
16 May, 2000 (16.05.00)

Date of mailing of the international search report
06.06.00

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/00939

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N15/12, 5/10, 1/15, 1/19, 1/21, C12P21/02, C07K14/715, 16/28, G01N33/53, 33/15, 33/50		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N15/00-90		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
GENBANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ PIR/SWISSPROT/GENESEQ		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Biochemical and Biophysical Research Communication, 193(1), May 28 1993 Satoru Kumaki et al., "Cloning of the mouse interleukin 2 receptor γ chain: demonstration of functional differences between the mouse and human receptors", p. 356-363	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
16.05.00	06.06.00	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関 4 番 3 号	特許庁審査官 (権限のある職員) 鈴木 恵理子 印	4B 9838
	電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Experimental Hematology, 19(9), Oct. 1991 Karen Ehrenman et al., "The erythropoietin receptor gene: Cloning and identification of multiple transcripts in an Erythroid Cell Line OCIM1", p. 973-977	1-12
A	Blood, 78(10), Nov. 15 1991 Constance Tom Noguchi et al., "Cloning of the human erythropoietin receptor gene", p. 2548-2556	1-12
A	US, 5 3 7 8 8 0 8, A (GENETICS INST INC) 3. 1月. 1995 (03. 01. 95) 第2図 (ファミリーなし)	1-12
P, A	WO, 99/47538, A1 (HUMAN GENOME SCI INC) 23. 9月. 1999 (23. 09. 99) p. 134-135 (ファミリーなし)	1-12